

Aus der Medizinischen Klinik der Universität

E r l a n g e n

Direktor: Prof. Dr. med. N. Henning.

Vergleichende .

nephelometrische und kjeldahlometrische

Analysen von Präzipitaten.



INAUGURAL-DISSERTATION

zur

ERLANGUNG der DOKTORWÜRDE

der

HOHEN MEDIZINISCHEN FAKULTÄT

der

FRIEDRICH ALEXANDER UNIVERSITÄT

zu

ERLANGEN

Vorgelegt von

Hermut Warnatz

aus Coburg (Oberfranken)



Digitized by the Internet Archive
in 2026

Dekan: Prof. Dr. F. Heim.

Referent: Prof. Dr. N. Henning.

Tag der mündlichen Prüfung: 25.6.1959.

VERGLEICHENDE ANALYSEN VON PRÄZIPITATEN

UNTER VERWENDUNG EINER NEPHELOMETRISCHEN UNTERSUCHUNGSMETHODE
DER PRÄZIPITATSTICKSTOFFBESTIMMUNG NACH HEIDELBERGER-KENDALL

SOWIE VERSCHIEDENER GELTECHNIKEN

von

F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ UND H. WARNATZ

Medizinische Universitäts-Klinik, Erlangen (Deutschland)

Die Untersuchungsmethoden zum Nachweis von Antigen-Antikörper-Reaktionen und damit von Antikörpern in Immunseren haben an Zahl in den letzten Jahren erheblich zugenommen. Traditionsgemäss wird hierbei zwischen Präzipitations- und Agglutinationsreaktionen unterschieden. Im folgenden haben wir uns im wesentlichen auf die Beurteilung von Präzipitationsmethoden beschränkt. Dabei muss beachtet werden, dass mit den verschiedenen Verfahren unterschiedliche Eigenschaften der Präzipitate geprüft werden, und dass der Antikörpernachweis mit wechselnd hoher Empfindlichkeit geführt werden kann.

Für die in der Immunologie praktisch gestellten Forderungen sind aus der Fülle der Nachweistechiken jedoch solche Methoden zu wählen, die möglichst rasch, genau und quantitativ arbeiten. Dabei haben sich neben dem klassischen Verfahren von HEIDELBERGER UND KENDALL¹ andere Methoden durchgesetzt, die unter Umständen mit geringerem zeitlichen und materiellen Aufwand auskommen, so—abgesehen von der einfachen Ringpräzipitation²—nephelometrische Untersuchungsmethoden sowie Geltechniken³⁻⁵, mit deren Hilfe man über das Auftreten von Präzipitaten qualitative und auch quantitative Aussagen machen kann. Im besonderen ist von diesen Methoden die Immunoelktrophorese nach GRABAR^{3, 4} zur Lokalisierung und Differenzierung des Antikörpers geeignet. In diesem Zusammenhang wurde von uns das Verfahren der Nephelometrie geprüft. Im Prinzip ist es längst bekannt; so gaben HOIGNÉ *et al.*⁶ vor kurzem eine nephelometrische Methode an, mit der es ihnen gelang, bei Patienten, die im Sinne einer Allergie sensibilisiert waren, das entsprechende Allergen zu identifizieren. Dieser Allergennachweis konnte allerdings von KLEINE, MATTHES UND MÜLLER⁷ nicht reproduziert werden. Im besonderen Hinblick auf die Fragestellung einer quantitativen Präzipitatbestimmung wurde jedoch die Nephelometrie noch nicht angewendet. Es sollte untersucht werden, was sie im Verhältnis zu den anderen Methoden zu leisten vermag und inwieweit sie sich einen Platz unter den Routinemethoden in der serologischen Forschung verschaffen würde.

Um diese Methoden zu untersuchen wurde nicht vom Krankenbett, sondern vom Tierexperiment ausgegangen. Dabei wurde die Absicht verfolgt, mit Sicherheit eine genügend hohe Antikörperbildung anzuregen, so dass die im folgenden angewendeten Verfahren unter den günstigsten Bedingungen durchgeführt werden konnten. Die Versuchsanordnung wurde so gewählt, dass bei der Sensibilisierung Präzipitine, d.h. präzipitierende Antikörper induziert wurden. Hierzu wurden Antigene verwendet, die derartige Präzipitine erfahrungsgemäss zu bilden vermögen, nämlich Humanserum (Mischserum) und Pferdeserum.

UNTERSUCHUNGSMATERIAL UND METHODIK

Tiermaterial

Zur Sensibilisierung wurden 10 Kaninchen mit einem durchschnittlichen Gewicht zwischen 2000 und 3000 g verwendet. Vor Versuchsbeginn wurden Gesamteiweiss im Serum kjeldahlometrisch sowie die Zusammensetzung der Serumeiweisskörper mit Hilfe der Papierelektrophorese bestimmt.

Bei 5 Kaninchen (Gruppe A) wurde zur Sensibilisierung als Antigen Menschenmischserum verwendet, das vorher wie die Tierseren auf seine quantitative und qualitative Proteinzusammensetzung untersucht wurde. Ikerische und hämolytische Seren fanden dabei keine Verwendung. Die 5 weiteren Kaninchen (Gruppe B) wurden mit Pferdeserum "Behringwerk" behandelt.

Sensibilisierungsmodus

Bei der Sensibilisierung wurde nach folgendem Schema vorgegangen: Den Tieren wurden 24 Tage lang jeweils 0.5 ml Menschen- bzw. Pferdeserum jeden zweiten Tag in die Ohrvene injiziert. 8 Wochen nach Beginn der Sensibilisierung wurden, da der Antikörpergehalt erheblich abgenommen hatte, den Tieren nochmals vier Injektionen von 0.5 ml Menschen- bzw. Pferdeserum in zweitägigen Abständen verabreicht.

Methoden

Die Blutentnahme erfolgte durch Venenpunktion unter den üblichen Bedingungen. Die durch spontane Gerinnung oder Zentrifugieren gewonnenen Seren wurden folgenden Untersuchungen unterworfen:

a. *Gesamteiweissbestimmung.* Ein Teil der Gesamteiweissbestimmungen wurde nach der KJELDAHL-Methode⁸, ein anderer Teil nach der Biuretmethode nach WEICHELBAUM⁹ vorgenommen.

b. *Präzipitatstickstoffbestimmungsmethoden nach HEIDELBERGER UND KENDALL^{1, 10, 11}.* Die Präzipitation für die Bestimmungen nach dem HEIDELBERGER-KENDALL-Verfahren und für die nephelometrischen Messungen erfolgte gleichzeitig unter genau gleichen Bedingungen. 6 Stunden nach der Blutentnahme wurde die Präzipitationsreihe in eigens hergestellten Spitzgläschen angesetzt. Dazu wurde eine geometrische Verdünnungsreihe des Antigens also des Menschen- bzw. Pferdeserums, mit durchschnittlich 7 Stufen angelegt. Zur Verdünnung wurde 0.9%ige Kochsalzlösung verwendet. 0.5 ml Antigenverdünnung wurden jeweils 0.5 ml Immuns serum, das aus Ersparnisgründen 1:4 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt werden musste, in das Präzipitationsröhrchen zugefügt. Es wurde also eine Präzipitationsreihe bei veränderlichem Antigen und konstanter Antikörperkonzentration hergestellt. Insgesamt wurden von jeder Verdünnungsstufe 7 Proben angelegt. Nun wurde jedes Gläschen je 1 Minute sorgfältig geschüttelt, um eine völlige Vermischung zu erreichen, und 2 Stunden lang in ein Wasserbad von 37° eingebracht. Danach wurden sie 18 Stunden lang nach nochmaligem sorgsamem Schütteln in einen Kühlschrank bei +2° gestellt. Von den 7 Proben wurden je 5 zweimal gewaschen. Dies erfolgte in einer Kühlzentrifuge bei circa 1800 Umdrehungen pro Minute bei einer Temperaturschwankung zwischen +1° und +5° 15 Minuten lang, wobei als Waschlösung jeweils 2 ml physiologische Kochsalzlösung zugefügt wurden. Nach dem Zentrifugieren wurden die überstehende Waschflüssigkeit abgehebert und die so behandelten Präzipitate sorgfältig wieder aufgeschüttelt.

In je zwei Proben wurde nun nach der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode der Präzipitatstickstoff bestimmt. Die Präzipitate wurden durch Zugabe eines Tropfens konzentrierter Natronlauge gelöst und quantitativ in einen Versuchungskolben übergeführt. Die Stickstoffbestimmung erfolgte nach der üblichen Mikro-Kjeldahlmethode.

c. *Quantitative Präzipitatbestimmung mit Hilfe der Nephelometrie^{6, 7, 12}.* Für die Nephelometrie wurde als Messgerät das Elektrophotometer "Elko II" der Firma Carl Zeiss* mit Trübungsmesszusatz benutzt. Die Wirkungsweise und der Lichtweg der Apparatur sind in der dem Gerät beigegebenen Gebrauchsanweisung genauer beschrieben, so dass auf eine eingehende Beschreibung verzichtet werden kann. Für die Durchführung der Versuche war im einzelnen wichtig, dass das zur Verminderung der Reflexe an der Reagenzglaswand in die Kammer des Trübungsmesseinsatzes eingefüllte Wasser gleichzeitig zur Konstanthaltung der Temperatur zwischen +1° und +5° verwendet werden konnte. Zur Erzielung eines Lichts einheitlicher Wellenlänge wurde bei der Streulichtmessung ein helles Grünfilter (Farbglas VG 9) benutzt. Die Achse des in das Reagenzglas einfallenden Lichtbüschels bildet bei der Apparatur einen Winkel von 68° mit der Achse des in den Trübungsmesseinsatz eintretenden Büschels. Die Messung erfolgte elektrophotometrisch

* Der Firma Carl Zeiss sei an dieser Stelle für die freundliche Überlassung des Gerätes gedankt.

mit der in der Gebrauchsanweisung angegebenen Kompensationsschaltung. Da eine entsprechende Eichlösung fehlte, diente als Vergleich der Trübungsglasstandard, dessen Trübungswert in absolutem Mass angegeben ist. Die gemessenen Trübungen wurden gemäss der Gleichung

$$\frac{\text{Rel. Trübung der Lösung}}{\text{Rel. Trübung des Standards}} = \frac{\text{Absolute Trübung der Lösung}}{\text{Absolute Trübung des Standards}}$$

in absolute Trübungseinheiten umgerechnet.

Für die Messung war es unbedingt notwendig, dass einwandfrei saubere Lösungen verwendet wurden. Deshalb wurden die verwendeten Kochsalzlösungen durch eine feinporige Glasfritte abgenutzt und zwar sooft, bis deren absoluter Trübungswert unter $0.2 \cdot 10^{-2}$ absoluten Trübungseinheiten lag. Auch die verwendeten Seren wurden ein- bis zweimal filtriert und zentrifugiert, so dass keine größeren, optisch sichtbaren Trübungspartikel mehr nachweisbar waren.

Bei der Messung wurde im einzelnen, wie folgt, vorgegangen: Die 3 restlichen der 5 gewaschenen Proben jeder Verdünnungsstufe wurden in das einwandfrei saubere Reagenzglas der Trübungsmesseinrichtung nacheinander quantitativ übergeführt – als Spülflüssigkeit diente physiologische Kochsalzlösung – und auf 3 ml aufgefüllt. Nachdem durch sorgfältiges Umrühren mit einem Glasstab eine gleichmässige Verteilung des Präzipitats erreicht war, wurde nach $1/2$, 1 und $1 1/2$ Minuten mit Hilfe der Messtrommel abgeglichen und abgelesen. Als massgebend wurde nach Vorversuchen allgemein der Wert nach 1 Minute angesehen. Die Temperatur während der Messung konnte, wie oben beschrieben, konstant zwischen $+1^\circ$ und $+5^\circ\text{C}$ gehalten werden. Der osmotische Druck im Messglas entsprach dem der physiologischen Kochsalzlösung.

Die zwei restlichen ungewaschenen Präzipitatproben jeder Verdünnungsstufe wurden danach auch nephelometrisch in der gleichen Weise, wie oben beschrieben, untersucht. Um Vergleichsmöglichkeiten mit den gewaschenen Präzipitaten zu erhalten, wurden ausserdem noch die Antigenverdünnungsreihe sowie die 1:4 verdünnten Immunsere nephelometrisch gemessen. Die erhaltenen relativen Trübungswerte wurden auf die genannte Weise in absolute Trübungseinheiten umgerechnet.

d. Der Schalentest nach OUCHTERLONY⁵. Hierzu wurde in eine chemisch reine Petrischale verflüssigter Elektrophoreseagar in einer Schichtdicke von 0.5 cm gegossen. Nach dem Erstarren wurden Vertiefungen für die Aufnahme der Antigen- und seitlich davon für die Aufnahme der Antikörpersuspension ausgestanzt. Das Antigen, hier Menschenmisch- bzw. Pferdeserum – wurde im Verhältnis 2:3 mit Aqua dest. verdünnt und diese Verdünnung mit flüssigem Agar im Verhältnis 1:1 gemischt. Von dieser Antigen-Agarsuspension wurde 0.1 ml in die vorgestanzten Vertiefungen eingebracht. Die Immunsere kamen entweder unverdünnt oder 1:1 mit physiologischer Kochsalzlösung verdünnt zur Anwendung und wurden in die jeweils entsprechenden Vertiefungen eingebracht.

e. Die Immunoelktrophorese nach GRABAR², 4, 13–16. Technische Einzelheiten sind dem einschlägigen Schrifttum zu entnehmen. Im einzelnen wurden die Antigensuspensionen, also Menschenmisch- und Pferdeserum, im Agargel elektrophoretisch aufgeschlossen und nach Abschluss des Trennvorganges die vorgesehenen Längskanäle mit den entsprechenden Kaninchenimmunsere beschickt. Die Masse und Mengen entsprachen dabei den unter *d.*) im OUCHTERLONYSchen Vorversuch angegebenen. Nach ausreichender Bildung von Präzipitationslinien wurde die Agarplatten getrocknet und die Linien mit Amidoschwarz 10 B gefärbt. Als Immunsere kamen die nach dem Sensibilisierungsmodus hergestellten Kaninchensere zur Anwendung.

f. Die Papierelektrophorese¹⁷. Die papierelektrophoretische Untersuchung des Serums wurde nach der Methode von GRASSMANN und HANNIG ausgeführt. Michaelispuffer mit einem pH = 8.6; Ionenstärke = 0.1; Whatmanpapier Nr. 1; 110 V Gleichspannung. Laufzeit etwa 13 Stunden.

Statistik^{18, 19}

Die gewonnen Versuchsergebnisse wurde anschliessend statistisch ausgewertet. Dabei wurden zunächst die nephelometrisch gefundenen Werte mit den nach der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode bestimmten Stickstoffwerten mit Hilfe der Korrelationsrechnung verglichen. Unter der Voraussetzung einer linearen Abhängigkeit hat die Regressionsgerade die allgemeine Form $y = bx + a$. Dabei stellt b den Regressionskoeffizienten dar, der als Tangens des Steigungswinkels der Geraden ein direktes Mass für die Abhängigkeit ist. Er ergibt sich gemäss der Formel:

$$b = \frac{S x_i y_i - S x_i \bar{y}}{S x_i^2 - \bar{x} \cdot S x_i}$$

Dabei bedeuten x_i bzw. y_i jeweils die Einzelwerte, die mit Hilfe der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode bzw. dem nephelometrischen Verfahren gefunden wurden. $\bar{x}$ und $\bar{y}$ sind die entsprechenden arithmetischen Mittel, die sich als die Quotienten der Summe der Einzelwerte x_i bzw. y_i und der Anzahl n dieser Einzelwerte berechnen lassen. Darüber hinaus wurde die Bestimmtheit B , die

angibt, welcher Anteil der Streuung von y sich aus der Veränderung von x erklären lässt, festgestellt; B wurde mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0.1% gesichert.

Bei den elektrophoretischen Ergebnissen wurden die Durchschnittswerte sowie die zwischen den Ausgangswerten und Kontrollen auftretenden Unterschiede nach den Grundregeln der Statistik untersucht.

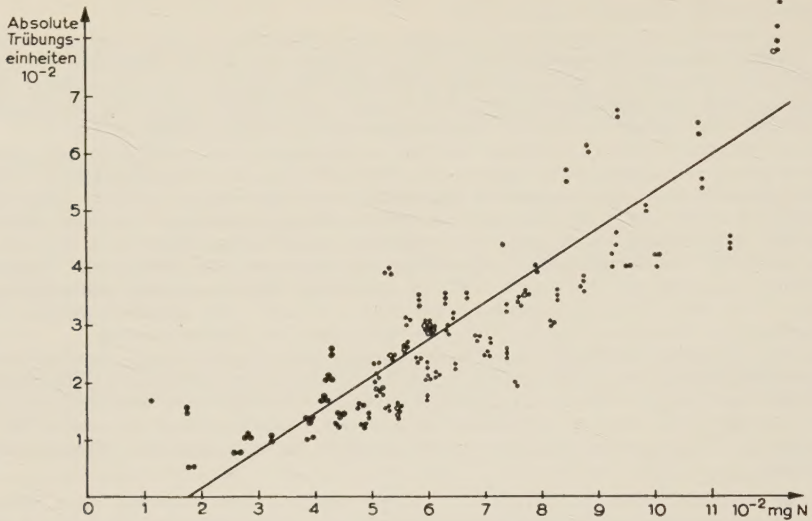


Fig. 1. (Gruppe A) Erklärung siehe Text.

ERGEBNISSE

I. Vergleich der nephelometrischen Untersuchungsergebnisse mit den nach der Heidelberger-Kendall-Methode gefundenen Stickstoffwerten

Die mit Hilfe der Präzipitatstickstoffbestimmungsmethode nach HEIDELBERGER UND KENDALL und die durch nephelometrische Messung des Präzipitats gewonnenen Ergebnisse sind in den Fig. 1 und 2 wiedergegeben. Zu Beginn der Versuche konnte

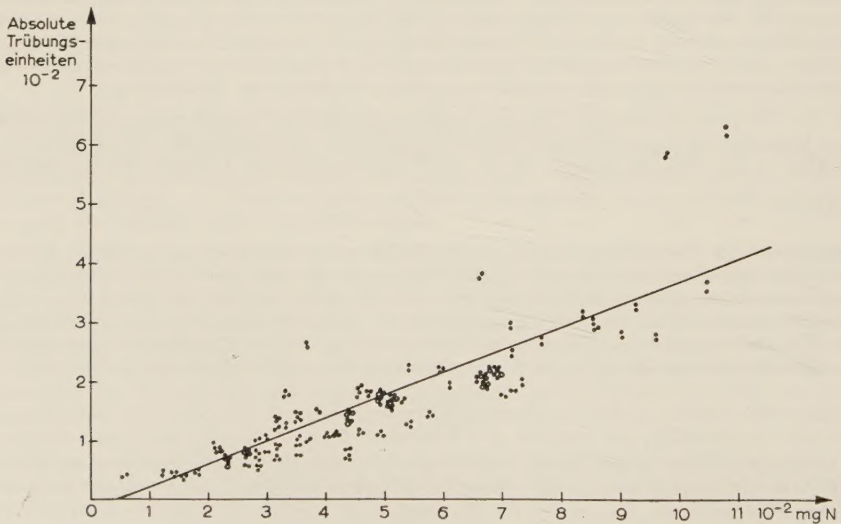


Fig. 2. (Gruppe B) Erklärung siehe Text.

in keinem Fall eine Präzipitatbildung nachgewiesen werden. In Fig. 1 sind die 175 Vergleichswerte, die bei der Präzipitation von Kaninchenimmenserum mit Menschenmischserum als Antigen gewonnen wurden (Gruppe A), erfasst und zwar sind auf der Abszisse die gemäss der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode durchgeführten Stickstoffeinzelmessungen in 10^{-2} mg N und auf der Ordinate die entsprechenden nephelometrischen Werte in 10^{-2} absoluten Trübungseinheiten, die in der oben genannten Weise auf den Trübungsglasstandard bezogen sind, graphisch eingezeichnet. In gleicher Weise wurden in Fig. 2 die 190 Ergebnisse wiedergegeben, die bei der Präzi-

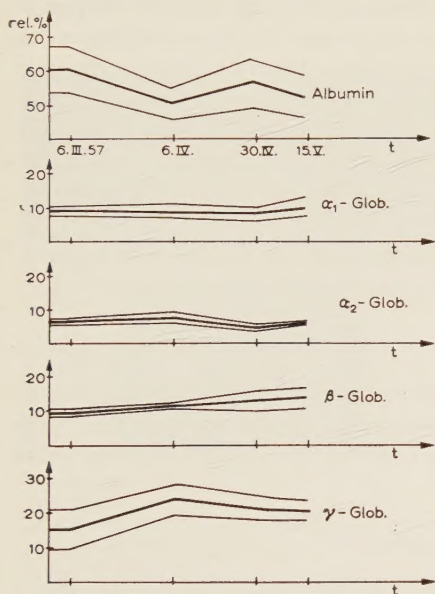


Fig. 3. Graphische Darstellung der papier-elektrophoretisch ermittelten relativen Prozente der Serumeiweissfraktionen der Kaninchen (Gruppe A) während der Sensibilisierung. Auf der Abszisse sind die zeitlichen Abstände, auf der Ordinate die relativen Prozente für jede Eiweissfraktion aufgetragen. Die stark ausgezogenen Linien stellen die Mittelwerte $\bar{M}$, die feiner ausgezogenen Linien die obere bzw. untere Begrenzung des statistisch errechneten Streubereiches dar. Man erkennt aus dem Kurvenverlauf der verschiedenen Fraktionen im wesentlichen folgendes: Kontinuierliche Albuminabnahme, indifferentes Verhalten der α -Globuline, leichter Anstieg der β - und stärkerer Anstieg der γ -Globuline im Verlauf der Sensibilisierung.

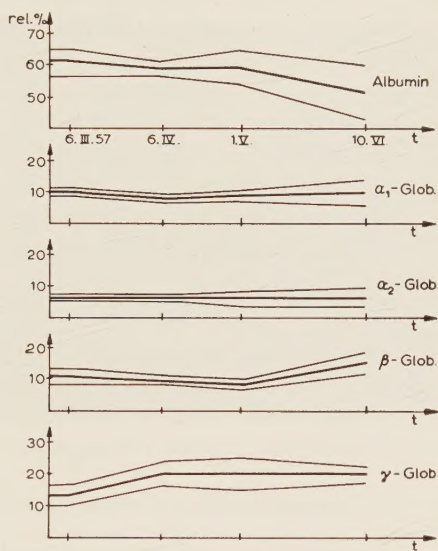


Fig. 4. Graphische Darstellung der statistisch ermittelten Durchschnittswerte sowie Streubereich der relativen Prozente der Serumeiweissfraktionen der Kaninchen von Gruppe B während der Sensibilisierung. Für die Erklärung der einzelnen Kurvenverläufe gelten die gleichen Angaben wie in Fig. 3.

pitation von Kaninchenimmenserum mit Pferdeserum als Antigen (Gruppe B) gefunden wurden. Die Präzipitastickstoffwerte und die nephelometrisch gefundenen Werte sind in der gleichen Weise, wie oben, aufgeführt. Ferner wurde eine Unterteilung gemäss den Versuchstieren und den Daten der Blutentnahme bei beiden vorgenommen. Dabei lässt sich erkennen, dass die Einzelwerte, die mit beiden unterschiedlichen Methoden gewonnen wurden, sich völlig entsprechen. Ein Masstab dafür

ist der Regressionskoeffizient b , der angibt, um wieviel absolute Trübungseinheiten die Präzipitattrübung im Durchschnitt zunimmt, wenn der Präzipitatstickstoffgehalt um $1 \cdot 10^{-2}$ mg N steigt. Danach besteht in dem Untersuchungsbereich eine gute lineare Abhängigkeit, die in der Regressionsgleichung $y = bx + a$ ihren Ausdruck findet. Für den Regressionskoeffizienten b ergibt sich bei Gruppe A eine Grösse von 0.64, bei Gruppe B eine Grösse von 0.38; die Steigung der Regressionsgraden ist also bei Gruppe A steiler als bei Gruppe B. Dabei ergibt sich eine Bestimmtheit B der Korrelation bei Gruppe A von 0.7401, bei Gruppe B von 0.6998; d.h. es lassen sich bei Gruppe A 74% und bei Gruppe B 70% der Streuung der mit Hilfe der Nephelometrie bestimmten Präzipitatenmenge durch lineare Regression aus Veränderungen der nach der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode ermittelten Präzipitatstickstoffmenge erklären. Die Abhängigkeit ist in beiden Fällen mit einer Überschreitungswahrscheinlichkeit von 0.1% gesichert. Es muss besonders darauf hingewiesen werden, dass dabei nicht nur Präzipitate entsprechend dem Maximum der Inhibitionskurve untersucht wurden, sondern auch von jedem anderen Punkt dieser Kurve gemäss der geometrischen Verdünnungsreihe.

Danach ist festzustellen, dass mit beiden grundsätzlich verschiedenen Präzipitatbestimmungsmethoden übereinstimmende Ergebnisse erzielt werden konnten.

2. Gesamteiweisswerte der Kaninchenseren

Bei den Gesamteiweissbestimmungen konnte bei allen 10 Versuchstieren folgendes festgestellt werden: Die Ausgangswerte waren gemäss den in der Literatur²⁰ angegebenen normal. Während der Sensibilisierung ergab sich bei den Kontrollen keine Veränderung im Gesamteiweissgehalt.

3. Die papierelektrophoretischen Untersuchungsergebnisse

Die Ergebnisse der papierelektrophoretischen Untersuchungen sind in den Fig. 3 und 4 zusammenfassend dargestellt. Die dabei gefundenen Ausgangswerte stimmen mit den in der Literatur angegebenen^{21, 22} gut überein. In beiden Gruppen zeigte sich bei der ersten Kontrolle 4 Wochen nach Beginn der Immunisierung eine Hypalbuminämie gegenüber den Ausgangswerten und ein γ -Globulinanstieg. Statistisch konnte nur in wenigen Fällen Signifikanz nachgewiesen werden. Trotzdem zeigen die Einzelwerte eine gewisse Gesetzmässigkeit im obigen Sinn. Bei der zweiten Untersuchung 8 Wochen nach Beginn der Sensibilisierung ergab sich bei den Eiweissfraktionen wieder die Tendenz zur Normalisierung. Bei der dritten Kontrolle, die bei Gruppe A 10 Wochen, bei Gruppe B 13 Wochen nach Beginn der Sensibilisierung angestellt wurde, konnte ein erneuter Albuminabfall, eine β -Globulinzunahme und nur geringfügige Veränderung der γ -Globuline festgestellt werden. Vor der dritten Kontrolle waren den Tieren, wie im Sensibilisierungsschema erwähnt, nochmals 4 Injektionen von je 0.5 ml Menschenmisch- bzw. Pferdeserum verabreicht worden.

4. Präzipitatcheck mit Hilfe von Gelmethoden

Sinn dieser Untersuchungen war zunächst, den frühesten Zeitpunkt des Auftretens von Präzipitat zu erfassen. Die Immunoelktrophorese sollte dabei zur Differenzierung solcher Präzipitate insbesondere im Hinblick auf die Ergebnisse des Vergleichs der HEIDELBERGER-KENDALL- und der nephelometrischen Methode dienlich sein.

Die unbehandelten Tierseren wiesen bei Kontakt mit dem entsprechenden Antigen in keinem Fall eine Präzipitatbildung auf, so dass heterologe Reaktionen ausgeschlossen werden konnten.

a. *Die Ergebnisse mit Hilfe des Ouchterlony-Tests.* Bei der ersten Kontrolle, 4 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn mit dem OUCHTERLONY-Test traten bei Gruppe A bei K_I eine deutliche, bei K_{III} und K_{IV} bereits drei Präzipitationslinien auf. Für die Gruppe B konnten bei allen Kaninchen je ein bis zwei schwache Präzipitationslinien festgestellt werden. Bei der zweiten Kontrolle, 8 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn waren in Gruppe A in jedem Falle mehrere Präzipitationslinien von unter-

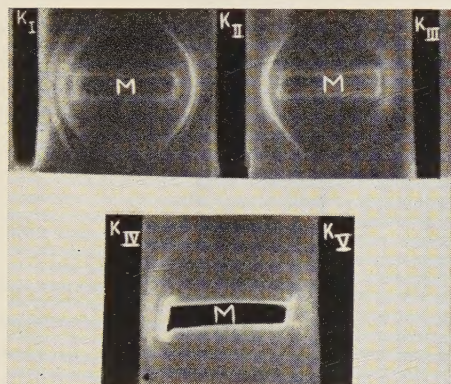


Fig. 5 zeigt die Ergebnisse mit Hilfe des OUCHTERLONY-Tests bei 2. Kontrolle der Gruppe A. Man erkennt deutlich die Unterschiede in Zahl und Intensität der gebildeten Präzipitationslinien bei den einzelnen Tieren (K_I – K_V). M = Menschen-Mischserum.

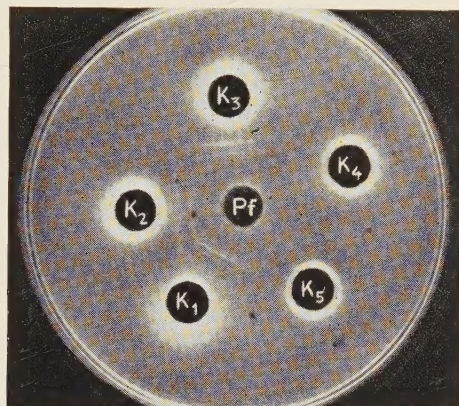


Fig. 6 zeigt die Ergebnisse mit Hilfe des OUCHTERLONY-Tests bei 2. Kontrolle der Gruppe B. Man erkennt auch hier Unterschiede in Zahl und Stärke der Präzipitationslinien bei den verschiedenen Tieren. Sie sind insgesamt etwas schwächer dargestellt als in Gruppe A. Pf = Pferdeserum (als Antigen).

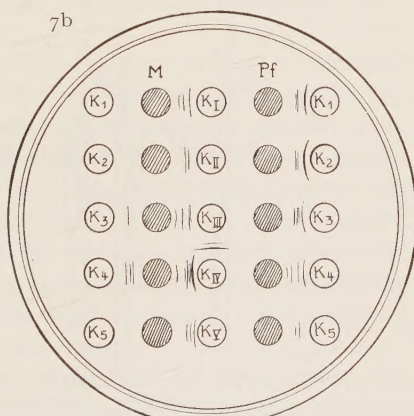
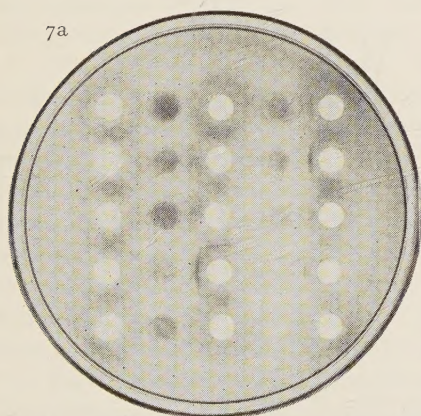


Fig. 7 zeigt die Ergebnisse mit dem OUCHTERLONY-Test bei 3. Kontrolle. Dabei wird in Fig. 7a das Originalphoto der Agarplatte und in Fig. 7b eine halbschematische Darstellung mit der entsprechenden Erläuterung der Versuchsanordnung wiedergegeben. M = Menschenmischserum (als Antigen); Pf = Pferdeserum (als Antigen); K_I – K_V = Antihuman-Kaninchenserum; K_1 – K_5 = Antipferd-Kaninchenserum. Weitere Erklärung siehe Text.

schiedlicher Deutlichkeit ausgeprägt (Fig. 5). Bei der Gruppe B zeigten sich wesentlich weniger und schwächere Präzipitationslinien (Fig. 6). Bei der dritten Kontrolle, die bei Gruppe A 10 Wochen und bei Gruppe B 13 Wochen nach Sensibilisierungsbeginn durchgeführt wurde, liessen sich im Plattentest für alle Seren der Gruppe A und B mehrere Präzipitationslinien nachweisen. Die Versuchsanordnung nach Fig. 7 wurde so gewählt, dass jeweils ein Antipferd-Kaninchenserum sowie ein Antimensch-Kaninchenserum gegen beide Mischantigene wirksam werden konnten. Dabei sollten unspezifische heterologe Reaktionen mit erfasst bzw. ausgeschlossen werden. Interessant erschien dabei, dass im Fall von K_3 und K_4 heterologe feine Präzipitationslinien

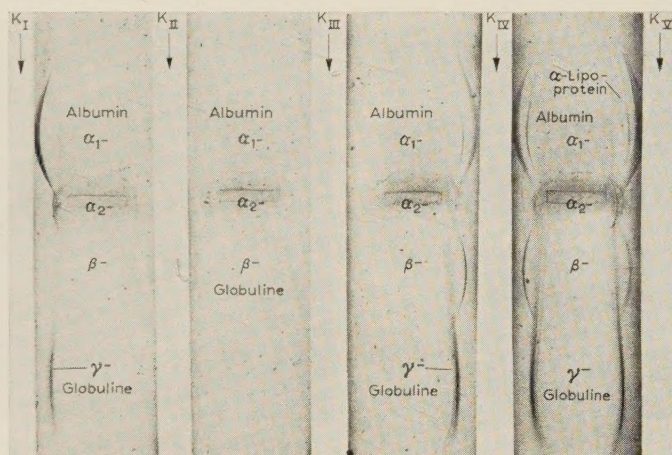


Fig. 8 zeigt die Immunelektrophorese von Menschenseren nach Präzipitation der einzelnen Serumfraktionen mit den Antihuman-Kaninchenserum der Gruppe A ($K_I - K_V$). Man erkennt deutlich die Unterschiedlichkeiten in Zahl und Intensität der einzelnen Präzipitationslinien bei Anwendung der verschiedenen Antihumanserum.

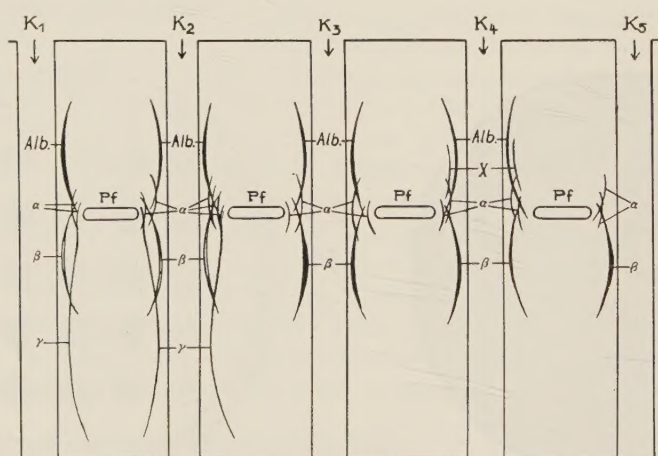


Fig. 9 zeigt eine halbschematische Darstellung der Immunelektrophoresen von Pferdeseren nach Präzipitation der einzelnen Serumfraktionen mit den Antipferd-Kaninchenserum der Gruppe B ($K_1 - K_5$). Die Wiedergabe der Ergebnisse in originalgetreuer, halbschematischer Darstellung erschien uns deshalb notwendig, weil die aufgetretenen Präzipitationslinien in dieser Versuchsreihe wesentlich schwächer waren als bei Gruppe A, wodurch die photographische Reproduzierbarkeit in Frage gestellt war.

gegen Menschenserum auftraten. Ausserdem fielen eine deutliche und eine schwache Präzipitationslinie im Bereich zwischen K_{III} und K_{IV} auf, d.h. zwischen zwei Antihumanseren.

b. Ergebnisse mit Hilfe der Immunoelktrophorese. Bei Differenzierung mit Hilfe der Immunoelktrophorese liess sich nachweisen, dass in allen Fällen, in welchen bei Anwendung des OUCHTERLONY-Verfahrens bei der zweiten Kontrolle 1 bis 2 Präzipitationslinien auftraten, vorwiegend nur Albumin und α -Fraktionen, während in den Fällen mit mehreren Linien bereits sämtliche Komponenten der Serumpoteine auspräzipitierten.

Bei der dritten Kontrolle waren vorwiegend Albumin, α - und β -Globuline auspräzipitiert. Bei Gruppe A waren sämtliche Fraktionen nachweisbar ausser bei K_{II} und K_{III} , wo die γ -Fraktion fehlte. In Gruppe B waren die Linien insgesamt etwas schwacher darstellbar, am besten präzipitierten K_1 und K_2 . Bei K_3 , K_4 und K_5 waren deutlich Anti- α - und Anti- β -Globulin gebildet, während Anti- γ -Globulin fehlte (Fig. 8 und 9).

DISKUSSION

Um die bei Antigen-Antikörper-Reaktionen auftretenden Präzipitate quantitativ zu erfassen, wurde einmal nach der Methode von HEIDELBERGER UND KENDALL, das andere Mal mit der Nephelometrie gearbeitet. Dabei handelt es sich um zwei Methoden, die völlig verschiedene Eigenschaften des Präzipitates prüfen. Während im ersten Fall der Gehalt der Präzipitate an Stickstoff quantitativ ermittelt wurde, wurde im zweiten Fall die Intensität des Streulichts an den Präzipitaten gemessen.

Das Verfahren nach HEIDELBERGER UND KENDALL wurde als Standardmethode der Präzipitatbestimmung angeführt. Dabei beschränkten wir uns auf die Bestimmung des Präzipitatstickstoffs, ohne ihn in Antigen- und Antikörperstickstoff zu differenzieren. Eine solche Trennung war auch für einen Vergleich mit den nephelometrischen Ergebnissen nicht notwendig, da ja hierbei nur die Streulichtintensität des Gesamtpräzipitats gemessen wurde. Im einzelnen wurden alle Präzipitate unter den gleichen Bedingungen gewonnen.

Mit Hilfe der Stickstoffwerte, die mit der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode aufgestellt wurden, sollte die nephelometrische Bestimmungsmethode geprüft und geeicht werden. Für eine exakte Messung mit der Nephelometrie ist es zunächst wichtig, bei einer geeigneten, konstanten Wellenlänge zu arbeiten, was im vorliegenden Falle durch ein helles Grünfilter erreicht wurde. Weiterhin ist bei nephelometrischen Bestimmungen zu beachten, dass die Intensität des Streulichts vom Dispersitätsgrad und der Konzentration der Teilchen abhängig ist. Es wäre also bei einer Konzentrationsbestimmung mit Hilfe der Streulichtmessung eine konstante Teilchengrösse die Voraussetzung. Das war nicht von vornherein bei einer Erfassung der Präzipitate über den Gesamtbereich der Inhibitionskurve zu erwarten.

Durch vergleichende Betrachtung der Präzipitartikel im Strahlengang des Nephelometers konnte festgestellt werden, dass die Präzipitate mit einer geringen Schwankungsbreite in der gleichen Grössenordnung lagen. Voraussetzung dafür war, dass die Bedingungen der Präzipitierung, wie Temperatur, osmotischer Druck, Umdrehungszahl beim Zentrifugieren usw. genau konstant gehalten wurden. Nur dadurch und durch Ausschaltung von Fehlerquellen, wie der Reinheit der verwendeten

ten Lösungen, lässt sich die gute lineare Abhängigkeit zwischen den durch Nephelometrie und den mit der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode gewonnenen Ergebnissen erklären. Die Bestimmtheit dieser Abhängigkeit hätte sich durch Einengung des Untersuchungsbereiches noch verbessern lassen. Interessant ist in diesem Zusammenhang der unterschiedliche Wert der beiden Regressionskoeffizienten b bei den Gruppen A und B. Die Ursache dafür kann nur in einem unterschiedlichen Verhältnis der Teilchengrösse bzw. der Zahl der Teilchen pro Volumeneinheit und damit der gemessenen Streulichtintensität zum Stickstoffgehalt der Präzipitate liegen.

Da sich in der Grobheit der Präzipitate vor und nach dem Kühlzentrifugieren erhebliche Unterschiede ergaben, wurde vergleichend mit den gewaschenen Präzipitaten unter den gleichen Bedingungen angesetzte, aber nicht gewaschene Präzipitate nephelometrisch untersucht. Die in Fig. 10 wiedergegebene Kurve I zeigt dabei die Inhibitionskurve der gewaschenen Präzipitate, d.h. die Streulichtänderung gemäss

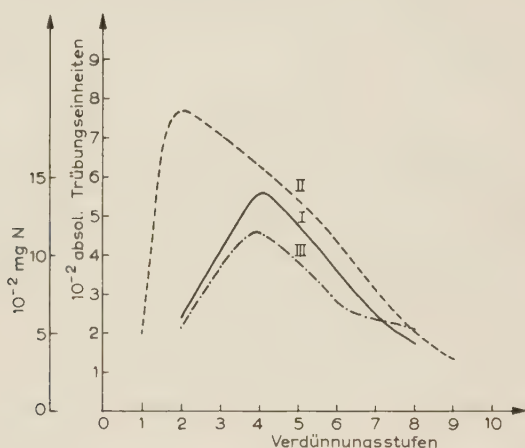


Fig. 10 zeigt die gemessenen Streulichtwerte der gewaschenen (Kurve I) und der ungewaschenen (Kurve II) Präzipitate sowie die Präzipitat-Stickstoffwerte (Kurve III) gemäss den Stufen der geometrischen Verdünnungsreihe bei Kaninchen K_{II} ; die Kurven verliefen bei den anderen Versuchstieren gleichartig.

der geometrischen Verdünnungsreihe; diese Kurve stimmt etwa mit der Kurve III überein, die sich unter Berücksichtigung des Regressionskoeffizienten b durch Eintragung der Stickstoffwerte, die mit der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode gewonnen wurden, auf der Ordinate im entsprechenden Masstab ergibt. In Kurve II ist der Verlauf der Streulichtwerte der ungewaschenen Präzipitate gemäss der geometrischen Verdünnungsreihe im gleichen Masstab wie die gewaschenen Präzipitate in Kurve I dargestellt. Von vornherein ist dabei zwischen den beiden Kurven ein Unterschied unter Berücksichtigung der Eigentrübung des Immunsersums und der geometrischen Verdünnungsreihe des Antigens zu erwarten.

Während bei grosser Antigenverdünnung die beiden Kurven in geringem Abstand voneinander praktisch parallel verlaufen, wobei sich die Verschiebung durch die Eigentrübung der Seren erklären lässt, tritt vor und im Maximum der Kurve I eine erhebliche Abweichung der beiden Kurven voneinander auf. Auffällig ist, dass die Maxima der beiden Kurven an ganz verschiedenen Stellen liegen und zwar dass das der Kurve II immer bei einer geringeren Verdünnung des Antigens als das der Kurve I

liegt. Dies ist durch die Eigentrübung der Seren allein auf keinen Fall bedingt. Die Unterschiede lassen sich nur dadurch erklären, dass einmal durch die Prozedur des Waschens mit der Kühlzentrifuge die Präzipitate in ihrer Grobheit verändert, d.h. zusammengelagert wurden, was sich auch im Strahlengang des Nephelometers beobachten liess und zum zweiten – das gilt im wesentlichen für die grossen Unterschiede im Bereich vor dem Präzipitatmaximum gemäss der Kurve I – dass offensichtlich Präzipitate beim Waschen verloren gingen. Aus diesem Grund wurde versucht, durch Erhöhung der Umdrehungszahl und Verlängerung der Dauer des Zentrifugierens auch diese Präzipitate quantitativ zu erfassen; es ergaben sich aber meist nur geringe Verbesserungen. Die Ursache dafür liegt darin, dass die Präzipitate hier grössenordnungsmässig besonders klein waren, woraus eine Änderung der Streulichtintensität folgt und dass die durch "Schutzkolloidwirkung" der umgebenden Eiweisskörper bei geringen Verdünnungsstufen des Antigens in stabilerer Verteilung gehalten werden konnten.

Es konnte also gezeigt werden, dass die Werte, die mit den beiden Präzipitatbestimmungsmethoden gewonnen wurden, sich streng proportional verhalten; somit liess sich eine Eichkurve für die nephelometrischen Untersuchungsergebnisse aufstellen. Dies ist damit zu erklären, dass sich bei gewaschenen Präzipitaten, die durch Präzipitierung eines Immunserums gegen ein einheitliches Antigen entstehen, jedesmal die gleiche Grössenordnung einstellt und zwar über alle Verdünnungsstufen des Antigens. Gerade in dieser genauen Reproduzierbarkeit der Grösse der Präzipitatteilchen aber liegt die Hauptschwierigkeit der nephelometrischen Methode, deren Überwindung nur durch genaue Einhaltung eines einheitlichen Arbeitsschemas, das alle physikalischen Grössen während des Präzipitierens bis zur Messung berücksichtigt, gelingen kann. Hinzu kommt, dass auf peinliche Sauberkeit der verwendeten Lösungen und Seren geachtet werden muss, so dass die Nephelometrie gegenüber dem HEIDELBERGER-KENDALL-Verfahren als Routinemethode, sowohl was Arbeitsaufwand, als auch was Genauigkeit betrifft, kaum einen Vorteil aufweist. Interessant ist, dass sich die einheitliche Präzipitatgrösse durch Vergrößerung der Teilchen während des Kühlzentrifugierens ergibt und zwar scheinen sich die Präzipitate in verschieden starkem Masse zusammenzulagern, wie der Vergleich der beiden Regressionskoeffizienten der Gruppe A und B ergibt.

Bei Betrachtung der Ergebnisse mit Hilfe der Präzipitationsmethoden im Gelmilieu kann gesagt werden, dass diese zum qualitativen Nachweis von Präzipitaten und damit zum Nachweis von Antikörpern Ausgezeichnetes leisten. Insbesondere darf auf die relative Einfachheit und auf die Möglichkeit der Differenzierung mit der Immunoelktrophorese hingewiesen werden. Die Präzipitatbildung trat meist zeitlich konform mit der durch die HEIDELBERGER-KENDALL-Methode festgestellten auf. Ein sicherer quantitativer Nachweis war allerdings nicht möglich, obwohl Rückschlüsse auf die mengenmässige Verteilung im Immunserum aus der Stärke bzw. Dichte des ausgefallenen Präzipitats sowie aus der Anzahl der Fraktionen gezogen werden können. Interessant erscheint, dass bei der Differenzierung der gebildeten Antikörper am frühesten die Anti-Albumin- und Anti- α -Globulinimmunkörper auftraten und dass erst zu einem späteren Zeitpunkt Anti- γ -Globulin nachweisbar war. Da es sich bei der Sensibilisierung um ein Mischantigen handelte, in welchem quantitativ das Albumin am meisten vertreten war, kann diese Beobachtungstatsache lediglich auf eine quantitative Ursache zurückgeführt werden, insbesondere nachdem

bekannt ist, dass die sehr homogenen Albumine, wenn sie isoliert appliziert werden, relativ schlechte Antikörperbildner darstellen. Zu der Beobachtung, dass zwischen zwei gleichartigen Immunsere(n) (K_{III} und K_{IV}) eine Präzipitatbildung zustande kam, wird in einer späteren Mitteilung Stellung genommen. Von den heterologen Reaktionen bei K_3 und K_4 konnten die im OUCHTERLONY-Test aufgetretenen Präzipitationslinien immuno-elektrophoretisch als α - und zwar vorwiegend als α_2 -Globulin identifiziert werden. Dies deckt sich mit den Ergebnissen früherer Untersuchungen über heterologe Präzipitinreaktionen²³.

Was die Ergebnisse mit der Papierelektrophorese anbetrifft, so können hier die längst bekannten Tatsachen bestätigt werden, nämlich dass im Verlauf der Sensibilisierung die γ -Globuline als Ausdruck der Trägerfunktion dieses Serumglobulins für Antikörper, zunehmen; auch hiermit steht uns eine – allerdings grobe – Methode für den Nachweis gebildeter Antikörper zur Verfügung. Dass statistisch sich nur in den wenigsten Fällen eine Signifikanz für die Veränderungen während der Sensibilisierungen in der Albumin- und γ -Globulinfraktion nachweisen liess, hat seinen Grund wohl im wesentlichen in der geringen Zahl von nur je fünf Versuchstieren, wodurch eine Sicherung der Unterschiede besonders erschwert wird.

Vergleicht man abschliessend noch einmal die verschiedenen untersuchten Methoden zur Präzipitatbestimmung, so ergibt sich, dass die Gelmethode(n) zwar in recht einfacher Weise einen Antikörpernachweis ermöglichen und dass insbesondere die Immuno-elektrophorese eine Differenzierung und Lokalisierung dieser Antikörper gestattet – insofern sind diese Methoden für eine genaue Charakterisierung von Antikörpern unerlässlich –, dass aber für eine quantitative Erfassung derselben sich nur grobe Anhaltspunkte ergeben. In dieser Hinsicht sind das HEIDELBERGER-KENDALL- und das nephelometrische Verfahren überlegen. Stellen wir letztgenannte nochmals gegenüber, so kann zusammenfassend gesagt werden, dass zwar die nephelometrischen Untersuchungen eine streng lineare Abhängigkeit von den Präzipitatstickstoffwerten der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode ergeben, dass aber die als Voraussetzung für eine exakte Messung zu fordernde konstante Teilchengrösse der Präzipitate nur durch genaue Einhaltung der Arbeitsbedingungen zu erreichen ist und dass auch dann im Einzelfall eine Unsicherheit der Konzentrationsbestimmung besteht, so dass die Reproduzierbarkeit der Präzipitatgrösse zumindest mehrmals überprüft werden müsste.

ZUSAMMENFASSUNG

Es wurde an einem Material von insgesamt 10 Kaninchen, die mit zwei verschiedenen Mischantigenen (Menschenmischserum und Pferdeserum) sensibilisiert wurden, die Präzipitatenmenge als Ausdruck einer Antigen-Antikörper-Reaktion bei Zugabe von Antigen zum Immuns Serum bestimmt. Hierzu kamen vergleichend im wesentlichen zwei Methoden zur Anwendung: die Nephelometrie und die Präzipitatstickstoffbestimmungsmethode nach HEIDELBERGER UND KENDALL. Es sollte das Verfahren der Nephelometrie auf seinen Wert geprüft werden, insbesondere auch, inwieweit es sich als klinische Routinemethode eignen würde. Dabei ergab sich bei genauer Einhaltung eines Arbeitsschemas eine gute lineare Abhängigkeit zwischen den genannten Untersuchungsmethoden. Es konnte jedoch dem nephelometrischen Verfahren kein wesentlicher Vorzug gegenüber der HEIDELBERGER-KENDALL-Methode gegeben werden. Ausserdem wurden noch andere Präzipitatbestimmungsmethoden durchgeführt, nämlich die Immuno-elektrophorese nach GRABAR und der OUCHTERLONY-Test, die im Hinblick auf eine genaue Charakterisierung und Differenzierung der Antikörper eine wertvolle Ergänzung der beiden vorher genannten Verfahren darstellen.

SUMMARY

Antigen-antibody reaction, as expressed by the quantity of the precipitate formed upon addition of the antigen to the immune serum, was determined in a total of 10 rabbits which had

been sensitized with two different antigen mixtures (pooled human sera and horse serum). Essentially, two methods were used comparatively: nephelometry and the nitrogen-precipitation method of HEIDELBERGER AND KENDALL. The authors attempted to estimate the value of the nephelometric method, in particular from the point of view of its suitability for clinical routine tests. By strictly following a working schedule, they found a good linear relationship between the two methods, but no substantial advantage in favour of the nephelometric method was observed. The authors also carried out other methods for precipitate determinations, namely the immuno-electrophoretic tests as described by GRABAR, and OUCHTERLONY's test, which prove to be a valuable supplement to the two above-mentioned methods, from the point of view of an exact characterisation and differentiation of the antibodies.

LITERATUR

- 1 M. HEIDELBERGER UND F. E. KENDALL, *J. Exptl. Med.*, 50 (1929) 809; 52 (1930) 477; 61 (1935) 559; 61 (1935) 563; 62 (1935) 467; 62 (1935) 697 und 64 (1936) 161.
- 2 R. DOERR UND E. BERGER, *Klin. Woch.schr.*, 6 (1927) 1562.
- 3 P. GRABAR, *Bull. soc. chim. biol.*, 36 (1954) 65; *Zentr. Bakteriол. Parasitenk., Orig.*, 164 (1955) 15; *Ann. Acad. Sci. Fennicae, A II*, 60 (1955) 402.
- 4 P. GRABAR UND C. A. WILLIAMS, *Biochem. Biophys. Acta*, 10 (1953) 193, 17 (1955) 67.
- 5 O. OUCHTERLONY, *Arkiv Kemi Mineral. Geol., Ser. B*, 26, nr. 14 (1948); *Acta Pathol. Microbiol. Scand.*, 25 (1948) 186, 32 (1953) 231.
- 6 R. HOIGNÉ, W. GROSSMANN UND H. STORCK, *Schweiz. med. Woch.schr.*, 24 (1955) 578.
- 7 N. KLEINE, M. MATTHES UND W. MÜLLER, *Klin. Woch.schr.*, 35 (1957) 133.
- 8 L. HALLMANN, *Klinische Chemie und Mikroskopie*, Thieme, Stuttgart, 1954.
- 9 T. E. WEICHELBAUM, *Am. J. Clin. Pathol.*, 10 (1946) 40.
- 10 H. R. DEAN UND R. A. WEBB, *J. Pathol. Bacteriol.*, 29 (1926) 437, 31 (1928) 89.
- 11 M. HEIDELBERGER UND E. A. KABAT, *J. Exptl. Med.*, 67 (1938) 181.
- 12 G. KORTÜM UND M. KORTÜM-SEILER, in HOPPE-SEYLER/THIERFELDER's *Handbuch der physiologisch- und pathologisch-chemischen Analyse*, Springer, Berlin, 1953.
- 13 H. GÖTZ, G. BERG UND F. SCHEIFFARTH, *Z. Immunitätsforsch.*, 114 (1957) 72.
- 14 J. J. SCHEIDEGGER, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 7 (1955) 103.
- 15 F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ UND W. FRENGER, *Ärztl. Woch.schr.*, (1956) 573.
- 16 J. URIEL UND J. J. SCHEIDEGGER, *Bull. soc. chim. biol.*, 37 (1955) 165.
- 17 W. GRASSMANN, H. HANNIG UND M. KNEDEL, *Deut. med. Woch.schr.*, (1951) 333.
- 18 S. KOLLER, *Graphische Tafeln zur Beurteilung statistischer Zahlen*, Steinkopf, Dresden und Leipzig, 1940.
- 19 A. LINDER, *Statistische Methoden für Naturwissenschaftler, Mediziner und Ingenieure*, Birkhäuser, Basel, 1951.
- 20 D. WIRTH, *Grundlagen einer klinischen Hämatologie der Haustiere*, Urban und Schwarzenberg, Wien und Innsbruck, 1950.
- 21 F. SCHEIFFARTH UND G. BERG, *Z. ges. exptl. Med.*, 119 (1952) 550.
- 22 F. SCHEIFFARTH, K. H. KIMBEL UND G. BERG, *Naturwissenschaften*, 42 (1955) 214.
- 23 F. SCHEIFFARTH, H. GÖTZ UND K. SOERGEL, *Intern. Arch. Allergy Appl. Immunol.*, 10 (1957) 82.
- 24 J. OUDIN, *Compt. rend.*, 222 (1946) 115; *Ann. Inst. Pasteur*, 85 (1953) 336.

Eingegangen den 2. Februar 1958

L e b e n s l a u f.

Am 30.5.1935 wurde ich, Friedrich Karl Albin Hermann Warnatz, als zweites Kind des Amtsgerichtsrates Felix Warnatz und seiner Ehefrau Elfriede Warnatz geb. Liebe zu Leisnig in Sachsen geboren. 1936 wurde mein Vater als Amtsgerichtsdirektor nach Reichenbach im Vogtland versetzt. Als Angehöriger der deutschen Wehrmacht verunglückte er am 18.12.1940 tödlich bei Rouen in Frankreich.

Im Herbst 1941 trat ich in die Volksschule in Reichenbach ein und setzte deren Besuch in Bad Liebenwerda fort. 1945 wurde ich in das Gymnasium Casimirianum in Coburg in Oberfranken aufgenommen. Nach Abschluß der 9. Klasse legte ich an der gleichen Schule im Juni 1953 die Reifeprüfung ab.

Im November 1953 begann ich an der Friedrich Alexander Universität in Erlangen das Studium der Medizin. Nach fünf Fachsemestern bestand ich hier im März 1956 die ärztliche Vorprüfung. Nach einem Semester in München studierte ich weitere drei Halbjahre in Erlangen. Während dieser Zeit arbeitete ich in der Medizinischen Universitätsklinik an meiner Dissertation. Nach einem Semester in Wien und einem weiteren in Erlangen legte ich hier im Frühjahr 1959 die ärztliche Prüfung ab, die ich am 18.6.1959 bestand

Erlangen, den 19.6.1959.

